

Los sistemas CRISPR-Cas de defensa microbiana

Autor: Rinardo Belmar, Víctor Alfonso (Graduado en Biología, Máster en Microbiología, Alumno Predoctoral).

Público: Microbiólogos. **Materia:** Microbiología. **Idioma:** Español.

Título: Los sistemas CRISPR-Cas de defensa microbiana.

Resumen

Los sistemas CRISPR-Cas confieren inmunidad adaptativa contra la infección por fagos y plásmidos en arqueas y bacterias. El estudio de los loci CRISPR y las proteínas asociadas Cas están contribuyendo a la mejor comprensión de la complejidad en las interacciones virus-huésped, clave en la evolución y ecología de la vida. Además, presenta numerosas aplicaciones, desde el tipificado de microorganismos, hasta la edición del genoma. Este artículo ofrece una visión sintética de los sistemas CRISPR-Cas de defensa, sus mecanismos de acción, su diversidad, nociones sobre su regulación y evolución, así como sus principales aplicaciones.

Palabras clave: CRISPR-Cas, fago, plásmido, procariota.

Title: The CRISPR-Cas systems of microbial defense.

Abstract

CRISPR-Cas systems confer adaptive immunity against phage and plasmid infection in archaea and bacteria. It is a study of the CRISPR loci and the associated proteins Cas are contributing to the better understanding of the complexity in the host-virus interactions, key in the evolution and ecology of life. In addition, it offers numerous applications, from the typing of microorganisms, to the editing of the genome. This article offers a synthetic vision of the CRISPR-Cas defense systems, their mechanisms of action, their diversity, notions about their regulation and evolution, as well as their main applications.

Keywords: CRISPR-Cas, phage, plasmid, prokaryote.

Recibido 2018-05-30; Aceptado 2018-06-05; Publicado 2018-06-25; Código PD: 096160

1. INTRODUCCIÓN

Bacterias y arqueas son capaces de prosperar en ambientes inhóspitos para el desarrollo de otras formas de vida. Los procariotas han desarrollado y seleccionado a lo largo de su evolución, un diverso repertorio de mecanismos adaptativos que les confieren la capacidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, situaciones de alta competitividad por los recursos e intensa depredación. Gran parte de su éxito radica en su capacidad para expandir su repertorio genético, gestionar la homeostasis de sus genomas y desarrollar sistemas de defensa (Barrangou 2015a).

Los procariotas se enfrentan a la amenaza constante que genera la invasión de ácidos nucleicos durante la infección por fagos y la transferencia horizontal de genes (McGinn & Marraffini 2016). La capacidad para distinguir ácidos nucleicos propios de aquellos foráneos con potencial nocivo en la célula, constituye un ejemplo de sistema de defensa natural en bacterias y arqueas (Burmistrz & Pyrc 2015). Para ello, se hacen valer de una serie de mecanismos innatos inespecíficos, como son los sistemas de restricción-modificación, la infección abortiva y los sistemas de exclusión de superficies (Samson et al. 2013). Estos reconocen características genéricas de la infección, insuficientes para dar una respuesta eficaz de forma aislada.

Los recientemente descubiertos sistemas CRISPR-Cas de defensa, constituyen un sistema inmune adaptativo heredable único en procariotas (Burmistrz & Pyrc 2015; Marraffini 2015). Este sistema se haya representado en un 84% de las arqueas y el 45% de las bacterias²⁴⁰. Este sistema es capaz de reconocer las características específicas de fagos y plásmidos infectivos y conferirles una resistencia rápida y eficaz contra los mismos (Marraffini 2015; Morange 2015; Rath et al. 2015).

Los sistemas CRISPR-Cas están constituidos por locus que presentan secuencias palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, denominados CRISPR por sus siglas en inglés, así como proteínas Cas asociadas que tienen

²⁴⁰ La diferencia en la prevalencia podría ser resultado del sesgo en el muestreo ya que se han analizado casi veinte veces más bacterias que arqueas (Rath et al. 2015).

un papel efector en los mecanismos de defensa y que son codificadas en genes próximos a CRISPR (McGinn & Marraffini 2016).

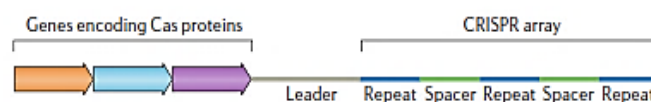
Evidenciar la existencia de un sistema inmune adaptativo basado en CRISPR en procariotas ha sido el resultado de un largo y tortuoso proceso de investigación en las últimas décadas (Morange 2015). En 1987, se describieron por primera vez en *Escherichia coli* agrupaciones de repeticiones inusuales de nucleótidos en su genoma, cuya importancia biológica no pudo ser determinada por la falta de homología con otras secuencias (Burmistrz & Pyrc 2015; Marraffini 2015). En el año 2000, Francisco J. M. Mojica y colaboradores, detectaron un gran número de estas secuencias repetidas en numerosas bacterias, arqueas y mitocondrias (Mojica et al. 2000). En 2002, Mojica acuñó el acrónimo CRISPR para referirse a estas secuencias y fue recogido por primera vez en un artículo científico publicado Jansen y sus colaboradores donde revelaban que los loci CRISPR se transcribían en pequeños ARN en *Archaeoglobus fulgidus* y los genes *cas* comprendían una familia de genes asociados con los loci CRISPR (Jansen et al. 2002). En 2005, tres grupos liderados por Bolotin, Mojica y Pourcel informaron de forma independiente que los espaciadores se ajustaban a secuencias presentes en fagos y plásmidos (Barrangou 2015a). Observaron que existía una correlación entre el número de espaciadores presentes en las cepas de *Streptococcus thermophilus* y el número de fagos que era capaz de infectarlas. Se llegó a la conclusión que los espaciadores observados en CRISPR derivan de ácidos nucleicos de virus y plásmidos que son incorporados durante la infección y son empleados como elementos de reconocimiento de estos genomas (Barrangou 2015a; Barrangou 2015b). Estos resultados sugirieron un papel de los sistemas de CRISPR-Cas en la prevención de la infección por fagos y conjugación por plásmidos (Makarova et al. 2006). Todos estos datos fueron integrados en el desarrollo de un modelo de inmunidad basada en CRISPR-Cas que recuerda a la interferencia de ARN en eucariotas y que presenta ciertas similitudes con el observado en mamíferos (Barrangou 2015a; Marraffini 2015). Esto se confirmaría más tarde con otros estudios que han contribuido a descubrir con mayor detalle los fundamentos moleculares y mecanismos de acción básicos que subyacen a la inmunidad basada en los sistemas CRISPR-Cas, su implicación en otras funciones celulares, como es la regulación de genes implicado en virulencia, así como sus aplicaciones.

Sin duda, el interés por los sistemas CRISPR-Cas ha aumentado en los últimos años y su investigación está progresando a gran velocidad (Marraffini 2015). El descubrimiento y mejor entendimiento de este sistema de defensa añade a nuestra comprensión una visión más clara de la complejidad de la interacción virus-huésped, un factor clave en la evolución y ecología de la vida. Además, constituye una fuente de herramientas muy valiosa, como la edición genomas y el control de la expresión génica en eucariotas (Lundgren 2015). En esta revisión bibliográfica descriptiva se ofrece una visión general y sintética de los sistemas CRISPR-Cas de defensa, sus mecanismos de acción, su diversidad, algunas nociones conocidas sobre su regulación, su evolución, así como sus principales aplicaciones.

2. DESARROLLO Y DISCUSIÓN

2.1. Componentes y estructura básica de los sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas cuentan con un componente genómico y otro proteómico. El componente genómico corresponde al loci de ADN CRISPR cuya estructura se ilustra en la **Figura 1**. Aunque



la mayoría de los loci CRISPR se encuentran en el ADN cromosómico, también han sido localizados en plásmidos (Gödde & Bickerton 2006). Algunas bacterias

Figura 1. Estructura básica del locus CRISPR-cas. Fuente: Amitai & Sorek 2016.

contienen más de un locus CRISPR dentro de su genoma (Louwen et al. 2014). Estos están constituidos por pequeños fragmentos de secuencia nucleotídica denominados espaciadores, que presentan un tamaño que oscila entre los 21 y 72 nucleótidos, separados por secuencias cortas repetidas, también conocidas como repeticiones, con un tamaño de entre 25 a 40 nucleótidos. Los espaciadores presentan homología de secuencia con algunos virus, plásmidos y bacterias, no obstante, se desconoce el origen de gran parte de estos (Burmistrz & Pyrc 2015). Un locus CRISPR en bacterias puede contener desde unos pocos a varios cientos de unidades espaciadoras. Sin embargo, la mayoría contienen aproximadamente 50 unidades. Los espaciadores adquiridos nuevamente fruto de la reexposición a un mismo agente infeccioso se localizan en la misma cadena que la del espaciador original. Este hecho requiere que tanto las proteínas Cas involucradas en adquisición como en interferencia interactúen entre sí. La homología de secuencia entre los espaciadores y la diana determina la degradación de los ácidos nucleicos extraños. Por otro lado, las repeticiones intervienen en la

adquisición de nuevos espaciadores y la transcripción y maduración de los ARN de CRISPR (ARNcr) (Burmistrz & Pyrc 2015).

Por lo general, los loci CRISPR están flanqueados por secuencias ricas en A/T que contienen elementos promotores y sitios de unión a proteínas reguladoras (Yosef et al. 2012). Estos loci se ubican próximos a un conjunto de genes que codifican proteínas Cas, el componente proteómico de este sistema (**Figura 1**). Estas proteínas cumplen numerosas funciones, específicamente, son responsables de incorporar nuevas secuencias espaciadoras y permitir la exploración de secuencias diana, el reconocimiento de los ARN transcritos de CRISPR a las mismas, su apareamiento y escisión (Barrangou 2015b). Con el objetivo de evitar la autoinmunidad, algunos sistemas CRISPR-Cas reconocen secuencias cortas denominadas Motivos Adyacentes al Protoespaciador (PAMs), presente en el ácido nucleico extraño y no en el loci CRISPR (Amitai & Sorek 2016).

2.2. Mecanismo básico de acción

El mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas se divide en tres etapas básicas (**Figura 2**). La adaptación, inmunización o adquisición de espaciadores constituye la primera etapa (Shabbir 2016). Implica el reconocimiento e integración del ADN invasivo como un nuevo espaciador (Barrangou 2015b). Hay dos tipos de adquisición de los espaciadores, cuando el invasor no se ha encontrado previamente, y otro cuando hay un registro preexistente del invasor en el loci CRISPR (Rath et al. 2015). En este proceso está implicado el complejo enzimático formado por Cas1 y Cas2. La proteína Cas1 es una nucleasa dependiente de metales que se une a ADN de modo independiente a su secuencia. La proteína Cas2 posee actividad endoribonucleasa ya sea para ARN de cadena sencilla o ADN de cadena doble. Aunque la función exacta del

complejo Cas1-Cas2 se desconoce, es responsable de capturar fragmentos de ADN o ARN extraño (Mojica et al. 2009). Algunos estudios sugieren que Cas1 y Cas2 cortan fragmentos de ADN invasor (protoespaciadores) y catalizan su integración conformando un nuevo espaciador entre dos repeticiones contiguas presentes en la primera posición del locus CRISPR (Marraffini 2015; Shabbir 2016). Los protoespaciadores se encuentran adyacentes a PAMs. El análisis de los sistemas CRISPR-Cas de las tres divisiones mayores han mostrado que los PAMs son importantes para los sistemas de tipo I y II, pero no para el III. En los sistemas de tipo I y II, los protoespaciadores se cortan en posiciones adyacentes a una secuencia PAM, con el otro extremo del espaciador siendo cortado con un mecanismo de Cas1 que mantiene la regularidad en el tamaño de los espaciadores. La conservación de la secuencia PAM difiere entre los sistemas CRISPR-Cas y parece estar ligado evolutivamente a Cas1 y a la secuencia líder (Shabbir 2016). Cas1 realiza dos reacciones de escisión-ligación, produciendo la escisión en el final de las repeticiones implicadas y posteriormente se liga a los extremos el espaciador. Este mecanismo genera dos roturas de ADN de cadena simple en las repeticiones que flanquean el espaciador insertado, que serían completados por la acción de una ADN polimerasa (ADNpol) (Marraffini 2015). La interacción entre la secuencia líder y las proteínas Cas determina la orientación apropiada del nuevo espaciador incorporado (Yosef et al. 2012). Esta fase proporciona la memoria genética, prerequisite para neutralizar reinvasiones por ácidos nucleicos.

La expresión del locus CRISPR constituye la segunda etapa. Los mecanismos para producir ARNcr varían entre los tres sistemas principales CRISPR-Cas. En esta etapa se produce la transcripción de un largo preARN CRISPR (preARNcr) por la acción de una ARN polimerasa (ARNpol) codificada en el locus CRISPR. Después de la transcripción, el preARNcr es cortado por

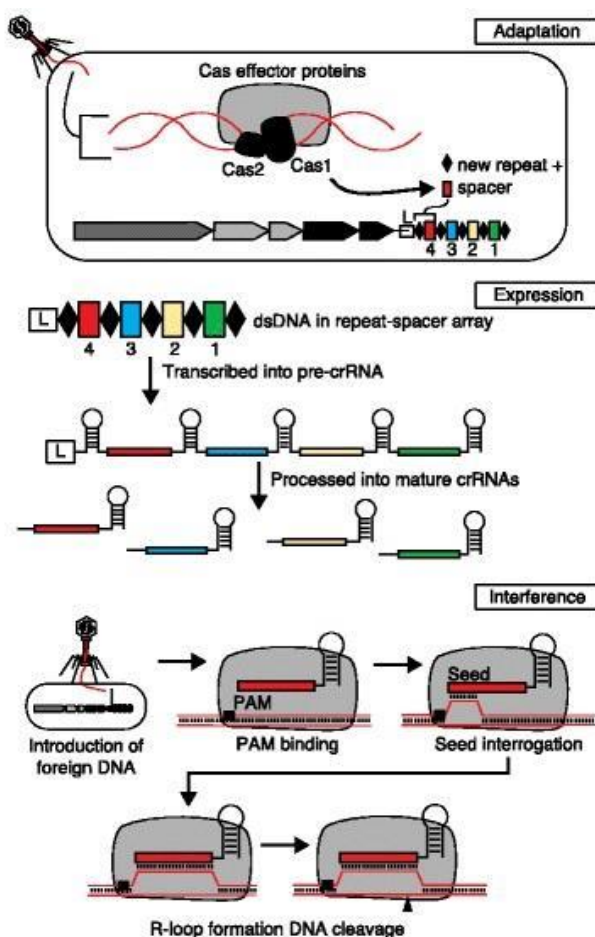


Figura 2: Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas en tres etapas. Fuente: Barrangou 2015b.

las repeticiones por acción de una endorribonucleasa específica para formar pequeños ARNcr. Según su función, los ARNcr se conocen como ARN guía o ARN de silenciamiento procariótico (ARNsip) (Marraffini 2015).

En la última etapa, también conocida como interferencia o de inmunidad, un complejo multiproteico, tomando el ARNcr junto con proteínas Cas, permite reconocer y unirse con perfecta o casi perfecta complementariedad con el ácido nucleico invasor. La interacción entre el complejo de ARNcr maduro, proteínas Cas efectoras y el ácido nucleico diana se inicia típicamente mediante la unión a PAM del ácido nucleico invasor en la mayoría de los casos, que desencadena la comprobación del ADN flanqueante por el ARNcr cargado. Si se extiende la complementariedad más allá de la secuencia diana, se forma un bucle R, y los dominios nucleasa de las proteínas efectora Cas escinden el ADN o ARN diana (Barrangou 2015b). El proceso de escisión puede verse inactivado debido a un mal apareamiento entre el ácido nucleico diana y el espaciador, o debido a la presencia de alguna mutación en PAM (Shabbir 2016). El mecanismo para distinguir ADN propio del extraño durante la interferencia está conservado en los 3 sistemas. Todos los ARNcr contienen una secuencia espaciadora y una porción de repetición en uno o ambos extremos. Esta repetición impide que el sistema CRISPR-Cas ataque al cromosoma, ya que el apareamiento de bases más allá de la secuencia del espaciador indica propiedad y previene el corte de ADN cromosómico (Rath et al. 2015).

El sistema necesita de las tres etapas para funcionar correctamente. No obstante, es de resaltar que cada etapa es independiente de las otras tanto temporal como mecánicamente y presentan diversas disimilitudes.

2.3. Diversidad de mecanismos de inmunidad CRISPR-Cas

Una vez descritos la estructura y mecanismo básico del sistema CRISPR-Cas de defensa, se puede entrar en más detalle en los diferentes tipos de sistemas conocidos y sus particularidades. Estos sistemas pueden clasificarse en tres tipos en función de la organización del locus CRISPR y el contenido de genes *cas* según la clasificación más adoptada. Estos son los sistemas CRISPR tipo I, II y III (Jiang & Doudna 2015). Recientes investigaciones amplían hasta seis los tipos de sistemas CRISPR-Cas descubiertos (Mohanraju 2016). A su vez, estos tres tipos se subdividen en 11 subtipos: I-A a I-F, II-A a II-C y III-A a III-B (Mohanraju 2016). Los genes que codifican las proteínas Cas1 y Cas2 están presentes en todos los tipos y subtipos de sistemas CRISPR-Cas necesarios para la fase de adaptación. No obstante, hay otras proteínas específicas de cada sistema implicadas en la biogénesis de ARNcr y la interferencia (**Figura 3**).

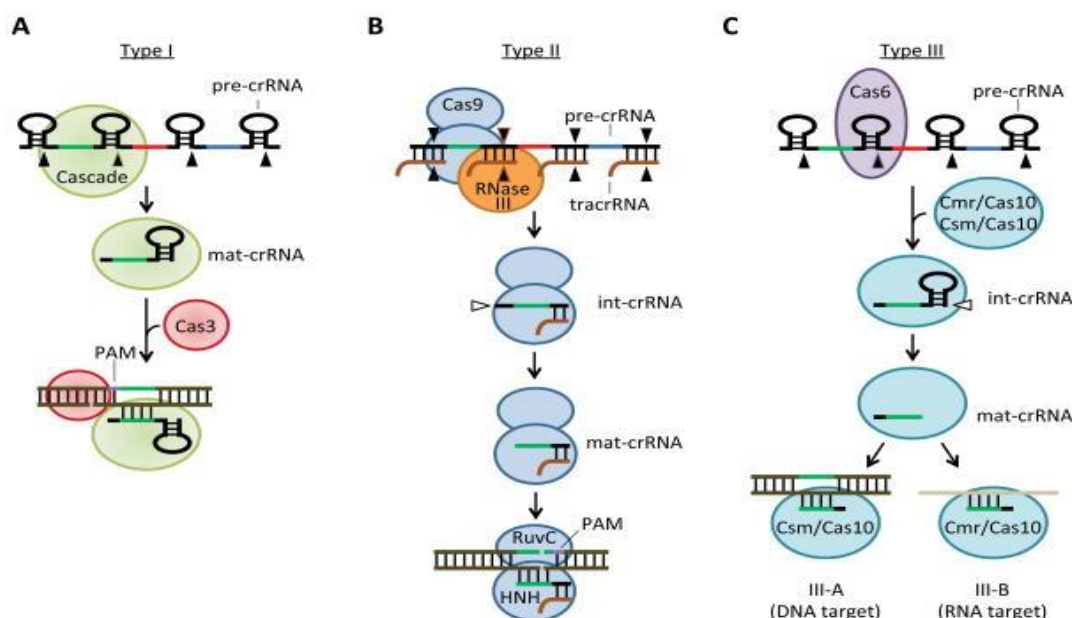


Figura 3. Mecanismos de biosíntesis e interferencia en los tres tipos de sistemas CRISPR-Cas. Fuente: Barrangou & Marraffini 2014.

El sistema más ampliamente distribuido en bacterias y arqueas es el sistema CRISPR-Cas de tipo I. Los diferentes subtipos codifican un número variable de proteínas Cas (Rath et al. 2015). El primer complejo identificado fue en *E. coli* K12 (tipo I-E), compuesto por cinco proteínas Cas (Cas6e, Cse1, Cse2, Cas7, y Cas5). La endorribonucleasa Cas6e contribuye a la maduración del preARNcr dentro del complejo Cascada. Este complejo reconoce y genera una escisión en la base del bucle del preARNcr para formar el ARNcr. Este bucle es resultado de la naturaleza palindrómica de las repeticiones (Jiang & Marraffini 2015). Esta escisión deja un extremo 5' de 8 nucleótidos que corresponde a una secuencia repetida acoplada a una secuencia espaciadora. El ARNcr permanece unido con el complejo Cascada y contribuye a la identificación del ADN extraño. Para ello se produce una interacción entre los primeros ocho nucleótidos de la diana y la secuencia complementaria del ARNcr guía. Además, un segundo requisito es la presencia de un PAM aguas arriba de la secuencia diana, que debe ser reconocido (Rath et al. 2015). El correcto apareamiento genera un cambio conformacional en Cascada que recluta a Cas3 para la degradación del ADN inmediatamente aguas abajo de la región de interacción con el espaciador ARNcr. Cas3 es codificada por el gen *cas3*, presente en todos los subtipos de tipo I. La proteína Cas3 presenta dos dominios: un dominio HD fosfohidrolasa N-terminal y un dominio helicasa C-terminal. Ambos dominios operan para degradar el ADN invasor (Shabbir 2016).

Los sistemas CRISPR-Cas de tipo II solo han sido identificados en bacterias. El sistema presenta 4 genes. Los genes *cas1*, *cas2* y *cas9* son comunes para los dos subtipos, mientras que *csn2* y *cas4* son específicos para los subtipos II-A y II-B respectivamente. Recientemente se ha sugerido un nuevo tipo, II-C el cual no presenta un cuarto gen (Mohanraju 2016; Rousseau et al. 2009). El gen *cas9* codifica una proteína multifuncional que participa en el proceso de adaptación, biogénesis de ARNcr y también en la escisión de un complejo formado con el ARNcr y el traARNcr (Rath et al. 2015). La biogénesis de ARNcr en el sistema de tipo II es diferente en comparación con los otros dos sistemas. Estos sistemas codifican un pequeño ARN adicional que es complementario a las secuencias repetidas del preARNcr. Este es conocido como ARN trans-activador (tracrRNA). El traARNcr se codifica en la cadena inversa aguas arriba del locus CRISPR. La unión del traARNcr al preARNcr conforma un ARN de doble cadena unido a través de las secuencias repetidas. Este ARN doble es escindido por la ARNasa III para formar ARNcr. Similar al tipo de inmunidad CRISPR de tipo I, la inmunidad de tipo II requiere de seis a ocho nucleótidos de secuencia diana complementarios al ARNcr guía, así como un PAM. Esta secuencia y el PAM se encuentran al final de la diana, de forma similar al tipo I. A diferencia de los otros dos sistemas, el ARNcr no contiene al espaciador completo, está truncado en un extremo. Tras la infección, el complejo ribonucleoproteico traARNcr / ARNcr / Cas9 explora el genoma viral para localizar secuencias PAM en la misma cadena que el ARNcr, cadena opuesta a donde se localizan en los sistemas de tipo I. La unión de Cas9 a PAM favorece el desenrollado de la secuencia diana inmediatamente aguas arriba del motivo. El ARNcr genera un bucle R en esta localización que desencadena la escisión por Cas9. Cas9 alberga dos dominios nucleasa, HNH y RuvC. Cada uno de estos dominios corta una cadena de ADN diana y el traARNcr actúa como un cofactor de Cas9 (Jiang & Marraffini 2015).

Los sistemas de tipo III son encontrados con frecuencia en arqueas, pero también han sido descritos en bacterias. Ambos subtipos de este sistema tienen genes *cas10* y *cas6*. La proteína Cas6 codificada por *cas6* es una endorribonucleasa, y la proteína Cas10 codificada por el gen *cas10*, cumple interviene en la interferencia con la diana (Shabbir et al. 2016). Al igual que en los sistemas de tipo I, el procesamiento del precursor se consigue mediante una endorribonucleasa, en este caso Cas6, sin embargo, las repeticiones encontradas no producen giros en el preARNcr, y los cortes ocurren por el "enroscamiento" del transcrito primario a lo largo de la Cas6. La mayoría de las proteínas Cas de tipo III están formando los complejos CSM, en el tipo III-A o CMR, en el tipo III-B, similares al complejo Cascada. En estos se produce la maduración del preARNcr. Aunque los dos subtipos tienen similitudes, el subtipo IIIA identifica y escinde ADN, mientras que subtipo IIIB, ARN extraño (Jiang & Marraffini 2015).

2.4. Regulación del sistema CRISPR-Cas

La mayor parte de la investigación se ha dirigido hacia la comprensión de los mecanismos de acción de estos sistemas. Sin embargo, para comprender cómo se utilizan los sistemas de CRISPR-Cas, un factor clave es la caracterización de su regulación. Este aspecto solo es recogido por un reducido número de estudios.

La primera caracterización de una vía de regulación de CRISPR-Cas se llevó a cabo en el sistema de tipo I-E en *E. coli*. En el estudio se pretendía conocer por qué este sistema presenta poca actividad natural. Se observó que la actividad del sistema podía verse favorecida por el estrés en membranas o el aumento de la expresión del regulador LeuO. Se sugirió además, que el factor de transcripción CRP actuaba como un antiactivador y bloqueaba el acceso de LeuO a su sitio de unión, impidiendo la activación del sistema (Lundgren 2015).

Otro estudio que vino de la mano de Patterson y su equipo (2015), arroja algo más de luz al asunto al investigar la regulación de un sistema CRISPR-Cas de tipo I-F en *Pectobacterium atrosepticum*. Estos observaron que una reducción del factor de transcripción CRP afectaba a la expresión de proteínas Cas. Para ello eliminaron *cyaA*, el gen que codifica la proteína que sintetiza AMPc, el cual activa a CRP, y se produjo una reducción en la expresión de Cas1. Por otro lado, se percataron que GalM presenta un efecto indirecto sobre la expresión de genes *cas*. GalM está implicado en el metabolismo de la galactosa, por lo que los autores especularon que, si GalM aumentaba los niveles de glucosa, la expresión de *cyaA* y la expresión de proteínas Cas se vería reducida. Se intuye una implicación de la glucosa en la regulación de la expresión de estos sistemas. Que el sistema inmune pueda estar regulado por factores metabólicos puede responder a diversas hipótesis. Entre ellas, la infección podría alterar el estado metabólico normal de las células, lo que resulta en una caída de los niveles de glucosa que activaría el sistema CRISPR-Cas. Además, una caída en el nivel de glucosa también podría constituir una respuesta celular a diversos tipos de estrés (Shabbir et al. 2016).

El hecho de que el CRP sea un regulador en ambos microorganismos, sugiere un posible papel central en la regulación de estos sistemas CRISPR-Cas. No obstante, queda un largo recorrido para conocer con detalle los fundamentos de la regulación de los sistemas CRISPR-Cas de defensa.

2.5. Algunos aspectos de la evolución del sistema CRISPR-Cas

A día de hoy se conocen diversos mecanismos de acción para los sistemas CRISPR-Cas que han sido seleccionados a lo largo de la evolución por cumplir un papel clave en la supervivencia de bacterias y arqueas. La presión ambiental constante generada por la infección por fagos y la transferencia horizontal de genes favorece a su vez una diversificación rápida de los loci CRISPR (Barrangou 2014). Las modificaciones adquiridas por integración de nuevos espaciadores en estos, pueden ser transmitidas de generación en generación y pueden proporcionar un nuevo rasgo fenotípico beneficioso para el huésped, una adaptación al ataque por los mismos. Esta heredabilidad constituye un ejemplo de evolución lamarckiana (Koonin & Makarova 2013). Posteriormente actúa la selección natural y otros principios de la evolución darwiniana en la descendencia (Shabbir et al. 2016).

Al igual que las células han desarrollado múltiples estrategias para contrarrestar la infección por virus, estos han desarrollado contramedidas a estas estrategias, estableciéndose un proceso coevolutivo virus-hospedador. La forma más básica de los virus para escapar de la actividad CRISPR-Cas es mediante mutagénesis al azar en nucleótidos clave para el reconocimiento por los ARNcr. Otro sistema anti-CRISPR-Cas se ha visto en fagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*. Estos codifican proteínas que permiten la infección en los sistemas I-F y I-E y cuya actividad no es conocida (Rath et al. 2015). Es probable que una gran cantidad de proteínas anti-CRISPR no hayan sido descubiertas todavía (Maxwell 2016). Por otro lado, se ha demostrado que el sistema CRISPR-Cas puede ser utilizado por virus para inducir la infección, como se ha observado en Bacteriofagos ICP1 de *Vibrio cholerae* (Seed 2013).

Las altas tasas de mutación en los genomas virales y las relaciones ecológicas virus-hospedador, indican que los sistemas CRISPR-Cas cumplen un papel clave en la sostenibilidad y homeostasis de los genomas procariotas y la evolución de los genomas víricos (Barrangou 2015a). La existencia y actividad del sistema inmunológico CRISPR indica la frecuencia y riqueza de depredadores e invasores en los ecosistemas, así como la intensa carrera armamentística establecida entre fagos y procariotas (Shabbir et al. 2016).

2.6. Aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas

La primera aplicación práctica de los sistemas CRISPR-Cas fue la tipificación bacteriana. Varios métodos de tipificación fueron desarrollados en base al tamaño del locus CRISPR, el contenido de los espaciadores, la detección de mutaciones puntuales dentro de los espaciadores y/o repeticiones (Rath et al. 2015). Otra aplicación se haya en la mejora de cultivos iniciadores para diferentes industrias. Estos cultivos que contienen bacterias, pueden ser seleccionados de forma que presenten loci CRISPR con resistencia mejorada a fagos que pueden causar problemas en la producción (Rath et al. 2015).

Sin embargo, las aplicaciones más conocidas provienen del uso del sistema CRISPR-Cas de tipo II como una poderosa herramienta de edición genética (Rath et al. 2015). La proteína Cas9 puede ser reprogramado fácilmente para crear roturas en la doble cadena de ADN en el genoma de una gran variedad de organismos, desde bacterias a células humanas. Esto permite la edición de su genoma y su regulación (Jiang & Marraffini 2015). La edición de genes por Cas9 ha mostrado un gran potencial terapéutico. Cas9 ha sido desarrollada como un agente antimicrobiano a ser dirigida específicamente a genes que confieren resistencia a antibióticos. Su potencial en terapia génica también ha sido demostrado, por ejemplo,

mediante la reparación del gen que codifica la proteína CFTR en células cultivadas de pacientes con fibrosis quística, cuya función truncada es responsable de la enfermedad. Cas9 también tiene potencial para el tratamiento de infecciones virales, como las causadas por el VIH y la hepatitis B. También se ha comprobado su eficiencia en el desarrollo de modelos de enfermedades en animales muy similares a los humanos. Un enfoque similar podría ser usado en un futuro para alterar el ADN en embriones humanos para prevenir enfermedades hereditarias complejas (Rath et al. 2015).

3. CONCLUSIONES

Bacterias y arqueas han desarrollado un sistema inmune adaptativo con el fin de regular el intercambio de material genético invasor, los sistemas CRISPR-Cas. Los diferentes tipos de sistemas CRISPR-Cas presentan diferencias filogenéticas y funcionales y algunos aspectos de su funcionamiento y regulación son desconocidos. No obstante, todos ellos se basan en un mecanismo de acción en tres pasos: la integración de espaciadores, la expresión de ARNcr y la interferencia. algunos

Estos sistemas desempeñan un papel clave en la supervivencia y evolución de procariotas. Los sistemas CRISPR-Cas han evolucionado en bacterias y arqueas sujetos a una fuerte selección favorecida por elementos genéticos infecciosos. La importancia biológica de la alta diversidad de los sistemas CRISPR-Cas puede responder a la presión ambiental impuesta por mecanismos anti-CRISPR presentes en fagos infecciosos. También es posible que las diferencias entre los tipos y subtipos de sistemas CRISPR-Cas proporcionen ventajas en diferentes condiciones impuestas por el estilo de vida o el entorno del huésped.

Por otro lado, los componentes de los sistemas CRISPR-Cas presentan un gran número de aplicaciones. Desde el tipificado de microorganismos y la mejora de cultivos iniciadores, hasta la edición del genoma de bacterias y eucariotas, la modulación de la expresión génica y el cribado genético. Su valor como herramienta de edición génica tiene un gran potencial en la curación de enfermedades genéticas y epigenéticas humanas. Pese a que la tecnología CRISPR-Cas9 se haya utilizado con éxito para curar enfermedades en modelos animales, es difícil de aplicar debido a las limitaciones éticas. En un futuro, la edición de genomas basados en tecnologías Cas9 ofrecerá nuevas aplicaciones médicas, especialmente en terapia génica, que tendrán un impacto significativo en la salud humana.

Bibliografía

- Amitai, G. y Sorek, R. 2016. "CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action". *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 14, nº2, pp. 67-76.
- Barrangou, R. 2015a. "The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond". *Current Opinion in Immunology*, nº31, pp. 36-41.
- Barrangou, R. 2015b. "Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines". *Genome Biology*, Vol.16, nº247.
- Barrangou, R. y Marraffini L.A. 2014. "CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity". *Molecular Cell*, nº54, pp. 234-244.
- Burmistrz, M. y Pyrc, K. 2015. "CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes". *Polish Journal of Microbiology*, vol. 64, nº3, pp. 193-202.
- Gödde, J.S. y Bickerton, A. 2006. "The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes". *Journal of Molecular Evolution*, vol, 62, nº6, pp. 718-729.
- Jansen, R., Embden, J.D., Gastra, W. y Schouls L.M. 2002. "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes". *Molecular Microbiol*, vol. 43, nº6, pp. 1565-1575.
- Jiang, F. y Doudna, J.A. 2015. "The structural biology of CRISPR-CAS systems". *Current Opinion in Structural Biology*, nº30, pp. 100-111.
- Jiang, W. y Marraffini, L.A. 2015. "CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems". *Annual Reviews of Microbiology*, vol.9, nº37, pp.209-228.
- Koonin, E.V. y Makarova, K.S. 2013. "CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes".

RNA Biology, vol.10, nº5, pp. 679-686.

- Lundgren, M. 2015. "New clues on the regulation of the CRISPR-Cas immune system". *Mobile Genetic Elements*, Vol. 23, nº06.
- Louwen, R., Staals, R.H.J., Endtz, H.P., Van Baarien, P. y Van der Oost, J. 2014. "The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria". *Molecular Biology Review*, vol.78, nº1, pp. 74-88.
- Makarova K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I. y Koonin, E.V. 2006. "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action". *Biology Direct*, nº16, pp.1-7.
- Marrafini, L.A. 2015. "CRISPR-Cas immunity in prokaryotes". *Nature*, vol. 526, pp. 55-67.
- Maxwell, K.L. 2016. "Phages Fight Back: Inactivation of the CRISPR-Cas Bacterial Immune System by Anti-CRISPR Proteins". *PLOS Pathog*, vol.12,nº1, pp.1-5.
- McGinn, J. y Marrafini, L.A. 2016. "CRISPR-Cas Systems Optimize Their Immune Response by Specifying the Site of Spacer Integration". *Molecular Cell*, nº64, pp. 1-8.
- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V. y Van der Oost, J. 2016. "Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems". *Science*, vol.353 (6299).
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. y Almendros, C. 2009. "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system". *Microbiology*, vol.155, nº3, pp. 733-740.
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. y Juez, G. 2000. "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria". *Molecular Microbiol*, vol. 36, nº1, pp. 244-6.
- Morange, M. 2015. "What history tells us¹_{SEP}XXXIX²_{SEP}CRISPR-Cas: From a prokaryotic immune system to a universal genome editing tool". *Journal of Biosciences, Indian Academy of Sciences*, vol.40, nº5.
- Patterson, A.G., Chang, J.T., Taylor, C. y Fineran, P.C. 2015. "Regulation of the Type I-F CRISPR-Cas system by CRP-cAMP and GalM controls spacer acquisition and Interference". *Nucleic acids research*; nº43, pp. 6038-6048.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. y Lundgren, M. 2015. "The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications". *Biochimie*, vol.117, pp.119-128.
- Rousseau, C., Gonnet, M., Le Romancer, M. y Nicolas, J. 2009. "CRISPI: a CRISPR interactive database". *Bioinformatics*. Vol. 25, nº24, pp. 3317-3318.
- Samson J.E., Magadán ,A.H., Sabri, M. y Moineau,S. 2013. "Revenge of the phages: defeating bacterial defences". *Nature Review Microbiol*, nº11, pp. 675–687.
- Seed, K.D., Lazinski, D.W., Calderwood, S.B. y Camilli, A. 2013. "A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity". *Nature*, vol. 494, pp. 489-491.
- Shabbir, M.A.B., Hao, H., Shabbir,M.Z., Hussain, H.I., Iqbal, Z., Ahmed, S., Sattar, A., Iqbal, M., Li, J. y Yuan, Z. 2016. "Survival and Evolution of CRISPR-Cas System in Prokaryotes and its Applications". *Frontiers in Immunology*, vol.7, nº375.
- Yoseff, I., Goren, M.G. y Qimron, U. 2012. "Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Research*, vol.40, nº12, pp.5557-69.